

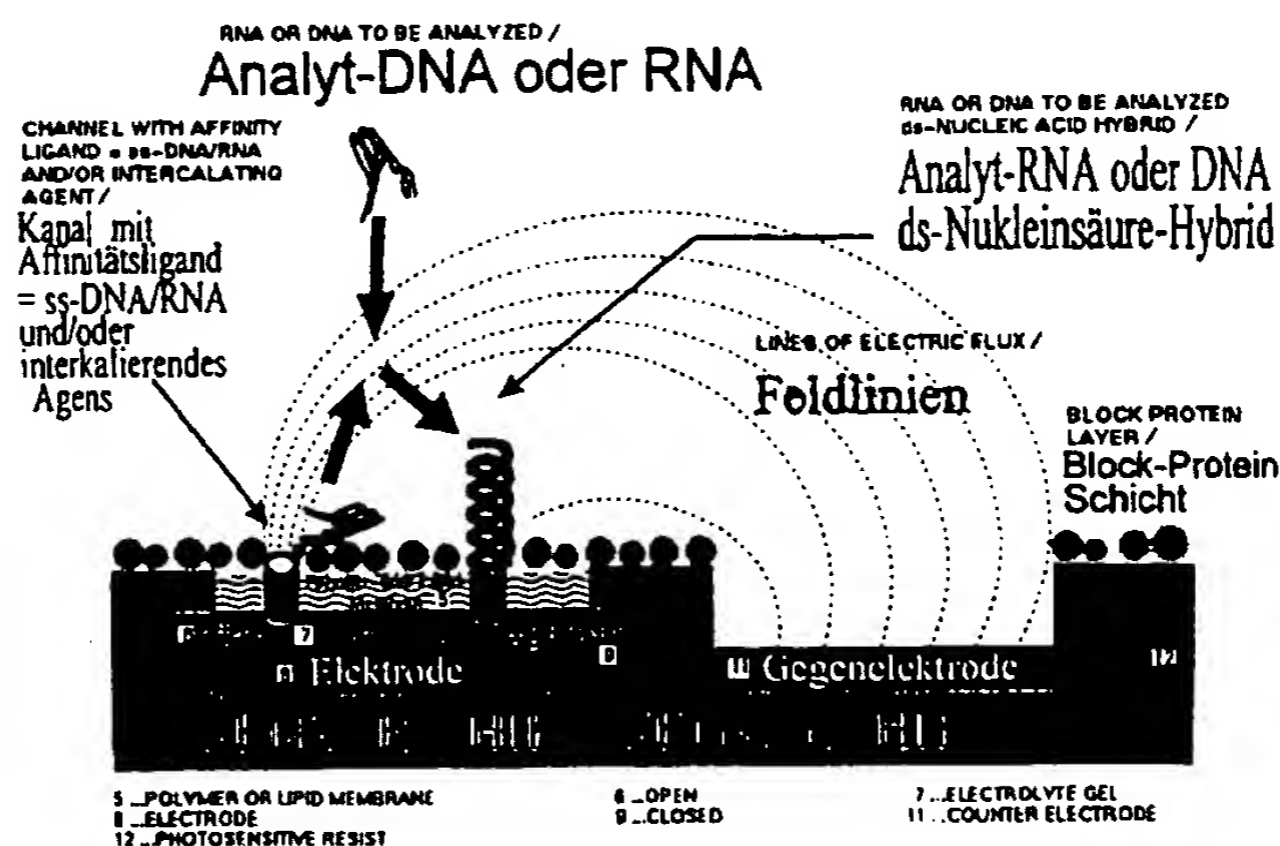


<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : G01N 27/327, C12Q 1/00</p>	A1	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/20203</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 5. Juni 1997 (05.06.97)</p>						
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT96/00230</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 21. November 1996 (21.11.96)</p> <p>(30) Prioritätsdaten:</p> <table style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 33%;">A 1943/95</td> <td style="width: 33%;">28. November 1995 (28.11.95)</td> <td style="width: 33%;">AT</td> </tr> <tr> <td>A 485/96</td> <td>14. März 1996 (14.03.96)</td> <td>AT</td> </tr> </table> <p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: SCHALKHAMMER, Thomas [AT/AT]; A-3072 Kasten Nr. 105 (AT). PITTNER, Fritz [AT/AT]; Khekgasse 40-42/11, A-1230 Wien (AT).</p>	A 1943/95	28. November 1995 (28.11.95)	AT	A 485/96	14. März 1996 (14.03.96)	AT	<p>(81) Bestimmungsstaaten: US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p>	
A 1943/95	28. November 1995 (28.11.95)	AT						
A 485/96	14. März 1996 (14.03.96)	AT						

BEST AVAILABLE COPY

(54) Title: **NOVEL MEMBRANES AND MEMBRANE DNA/RNA SENSORS**

(54) Bezeichnung: **NEUARTIGE MEMBRANEN UND MEMBRAN-DNA/RNA-SENSOREN**



(57) Abstract

The invention concerns a novel highly sensitive membrane sensor which, in particular using a novel membrane structure. Either the interaction between lipid layers is reinforced, using the reaction between organoboron compounds, and/or stable lipids of the general formulae according to figure 4 are used. This novel sensor is designed as a hybridization-controlled membrane channel biosensor. The membrane channel biosensor uses the bonding of DNA and RNA to an immobilized catcher oligonucleotide to control a membrane channel.

Neuartige Membranen und Membran-DNA/RNA-Sensoren

Die Erfindung bezieht sich auf die Konstruktion eines Membran-basierenden Sensortyps, welcher durch Verwendung neuartiger Membran- und Membran-Traeger-Systeme und/oder durch Nutzung der Nukleinsaeure-Hybridisierung zum Bau von insbesondere DNA- und RNA-Sensoren geeignet ist.

Als Nachweissysteme für beliebige biologische Moleküle sind Enzymsensoren bekannt, die die katalytische Wirkung von Biomolekülen verwenden, um ein spezifisches Biosignal z.B. die Konzentration von Milchsaeure, Zucker, Aminosaeuren,... in ein unspezifisches chemisches Signal z.B. Konzentration von Wasserstoffperoxid umzuwandeln, welches sodann elektrochemisch in eine elektrische Groeße umgewandelt wird, die der gesuchten Analytkonzentration proportional ist. Als Nachweissysteme für DNA und RNA sind Enzym-markierte Assays (Northern-, Southern-Blott, PCR + ELISA,...) bekannt, die die katalytische Wirkung von Enzymen verwenden, um ein spezifisches Biosignal d.h. die Hybridisierung von DNA und RNA mit Hilfe eines z.B. Enzymlabels in ein unspezifisches chemisches Signal z.B. Konzentration von oxidiertem ABTS, in p-Nitrophenylphosphat, Indigoblau,... umzuwandeln, welches sodann elektrochemisch oder optisch ausgewertet wird. Es ist bekannt, daß diese Assays eine gute Sensitivitaet jedoch grundlegende Probleme durch unspezifische Hybridisierung und komplizierte Durchführung aufweisen. Als Nachweissysteme für DNA und RNA sind weiters optische Systeme wie Surface Plasmon Resonance - Sensoren bekannt, welche die Hybridisierung von DNA und RNA auf einem Sensorchip in ein optisches Signal umzuwandeln vermoegen. Es ist jedoch weiters bekannt, daß der große apparative Aufwand und die im Vergleich zu den Enzymassays maeßige und daher für viele Anwendungen nicht ausreichende Empfindlichkeit dieser Sensoren diese Technik nur für manche Bereiche einsetzbar macht.

Die Erfindung zielt darauf ab, durch einen neues Sensorprinzip und/oder einer neuartigen selektiven Membran die grundlegenden Einschränkungen insbesondere in der Nukleinsaeureanalytik zu beseitigen. Die essentielle Biokomponente soll in diesem Sensoraufbau nicht zur katalytischen Verstaerkung der Analytbindung Verwendung finden, sondern als selektive Barriere zur umgebenden Loesung. Der Analyt z.B. DNA oder RNA dient sodann direkt oder indirekt zur Steuerung des Ionenkanals. Durch diesen Ionenkanal koennen pro Sekunde und Kanal bis zu 10 Millionen Ionen in einen schmalen ($< 10 \mu\text{m}$) Membran-Elektrodenraum einfließen und dieser Ionenfluß direkt elektrochemisch (etwa 1-10 pA je offener Kanal), konduktometrisch, fluorimetrisch oder mit einer anderen geeigneten Methode bestimmt werden. Eine Stoerung des Meßsignals durch andere Komponenten der Loesung wird durch die selektive Membran unterdrückt. Die vorliegende Erfindung nutzt die genaue Immobilisierung eines kleinen Oligonukleotids und/oder einer interkalierenden Substanz am Eingang des Kanals. An diese wird anschließend der große Analyt (z.B. DNA oder RNA) am Kanaleingang selektiv gebunden.

Die zweite Teil des neuartigen Sensorkonzepts ist die Membrantechnologie. Es wird dabei der Vorteil der „black lipid membranes“ d.h. der freie Zugang zu beiden Membranseiten mit dem Vorteil der „self assembling membranes“ d.h. der stabilen Anordnung eines selbst aufbauenden Lipidfilms kombiniert. Die Wahl eines Photo- oder Elektropolymers als Trägermatrix für den Lipidfilm und die kovalente Kopplung der Lipidmonomere an diese Geloberflaeche stabilisiert den Lipidfilm gegen mechanische Zerstörung, bzw. gegen das Fließen des zweiten Lipidfilms der Doppelmembran.

Dünnschichttechnologische Verfahrensschritte sind ein weiterer wichtiger Teil im Rahmen des Sensoraufbaus. Dabei soll zuerst der elektrochemische Sensor nach etablierten dünnsschichttechnologischen Verfahren gefertigt werden. Sodann wird mit Photolacken z.B. aus der AZ - Serie (z.B. AZ 1505) die Rahmenstruktur für den Lipidfilm aufgebaut. Der nächste Schritt ist sodann die Füllung der hydrophoben Rahmenstruktur mit einem hydrophilen Gel Photopolymer als Trägersystem für die Lipidmembran. Diese beiden Schritte können technologisch vorteilhaft auch in umgekehrter Reihenfolge ausgeführt werden.

Die Kopplung des Fängeroligonukleotids an den Gramicidin Kanal erfolgt durch selektive chemische Modifikation der carboxyterminalen Struktur.

Die Erfindung zielt darauf ab, ein neuartiges, hochsensitives Sensorprinzip mit der Erfassung einzelner Moleküle zu schaffen. Die Empfindlichkeit wird real durch die Bindungskonstante (z.B. DNA/DNA bzw. RNA/DNA) und durch den Zeitbedarf des Aufeinandertreffens der beiden Nukleinsäuremoleküle begrenzt.

Weiters zielt die Erfindung auf den Aufbau solcher Sensoren mit Dünnschichttechnologie-kompatiblen Methoden wie Dünnschichtsubstraten, Sputtern und Aufdampfen der Metallelektroden, Einsatz von Photolacken und mit photosensitiven Polymeren hergestellten, dünnsschichttechnologischen Lipidmembranträgern ab und beinhaltet darüber hinaus auch den neuartigen Aufbau von Lipid- oder Polymermembranen an Phasen-Grenzflächen.

Die DNA-Analytik stellt immer größere Anforderungen an die Selektivität und Sensitivität von Meßsystemen. Schnellere und insbesondere einfachere Testverfahren in der DNA-Diagnostik ermöglichen vielfach erst die routinemäßige Bestimmung von Tumorgenen, Viren, Erbkrankheiten,... in der Arztpraxis oder zumindest abseits etablierter Universitätskliniken. Darüber hinaus kann auch die direkte Messung durch den Patienten neuartige Möglichkeiten eröffnen.

Der Einsatz des neuen Sensortyps ermöglicht die Nutzung der Fähigkeit zur Hybridisierung von Analyt-DNA und -RNA mit Fängeroligonukleotiden am Sensorkopf. Der Einsatz der neuen Membranen ermöglicht den Aufbau neuer Sensortypen unter Nutzung nahezu aller biochemischer und chemischer Affinitätsreaktionen. Ein solcher Sensor kann

Sensorrohlinge aufgebracht werden und durch Photocrosslinker (meist Carben und Nitren - Bildner z.B. 4,4'-Bisazidostilben-2,2'-disulfonsaeure) mit langwelligem UV (360 nm) zu Polymerfilmen vernetzt werden. Die reaktiven funktionellen Gruppen des Polymers koennen dann aktiviert und zur Kopplung von Proteinen, Peptiden und Lipiden verwendet werden.

Da Lipidfilme sowohl untereinander als auch an der Zellwand nicht durch kovalente Wechselwirkungen gebunden sind, koennen sie leicht unter desintegrierenden Bedingungen extrahiert werden. Dazu eignen sich hydrophobe Agenzien, Detergentien und Alkalien.

Zum Aufbau einer stabilen Lipidmembran muessen zwei grundsaeztliche Probleme geloest werden : Stabile Bindung des Lipidfilms an die Unterlage und das Verhindern des Abfloatens des oberen Lipidfilms im Lipiddoppellayer. Die stabile Bindung des unteren Lipidfilms an die Geloberflaeche erfolgt durch hydrophobe, ionische oder kovalente Kopplung von z.B. Thiolipiden an eine chemisch reaktive Oberflaeche. Dabei wird vor der Aufbringung des Thio-Lipidfilms auf die Oberflaeche dieselbe in folgender Weise modifiziert : Einfuehrung reaktiver Gruppen (z.B. durch Sauerstoff- oder Chlorplasma) und Kopplung der reaktiven Gruppen mit bivalenten Crosslinkern wie z.B. Divinylsulfon. Der in der genannten Weise aktivierte Sensor wird in ein Bad mit in organischem Loesungsmittel geloesten Thio - Lipiden getaucht, es erfolgt das „self assembling“ und die kovalente Bindung des Lipidfilms. Ein Anteil an frei beweglichen Lipiden ermoeoglicht die fluide Struktur der Lipidmembran.

Bei Verwendung von nicht bolaamphiphilen Esterlipiden - analog eukaryontischen Zellen - muss der zweite Lipidfilm am Ersten kovalent gebunden verankert werden.

Die Verwendung der neuartigen zyklischen Transmembranlipide ersetzt eine herkoemmliche Doppellayermembran. Die zyklischen Lipide koennen in einer optimierten Synthese mit hoher Ausbeute gewonnen werden (meist 10 - 50 %). Die Lipide weisen aehnliche aber optimierte Struktur wie Tetraetherlipide aus manchen insbesondere thermophilen Bakterienmembranen auf. Der Aufbau als makrozyklisches Ringsystem ermoeoglicht eine hohe Stabilitaet und groesse thermische Belastbarkeit. Weiters ist ein Coating mit einem einzelnen Tauchvorgang durch eine Lipidgrenzschicht moeglich. Insbesondere die Kombination mit Boronsaeuren optimiert zusaetzlich die Haftung jeder Lipidmembran an einer meist hydrophilen Oberflaeche. Dabei kommt es zu einer Wechselwirkung von Organoboronsaeuren mit vicinalen cis-Diolen der jeweils anderen Phase. Diese Art der Haftungsverstaerkung ist den anderen insbesondere durch den geringen Platzbedarf des Bors ueberlegen, da dadurch die Lipidphase in keiner Weise verzerrt wird.

Die stabile Haftung des Lipidfilms an der Geloberflaeche erfolgt durch hydrophobe, ionische oder kovalente Wechselwirkung der Lipide mit der Supportoberflaeche. Dabei kann vor der

Beispiel 1 : Aufbau der Sensorsubstrate

Verwendung von Sensorsubstraten aus Alkali-, Pyrex-Glas, Aluminiumoxid oder Kunststoff (z.B. Polyimid)

- Herstellung von Photomasken über CAD, DXF - File und Patterngenerator
- Herstellung von Tochtermasken
- Hochvakuumbedampfung bzw. Sputtern der Elektroden
- 50 nm Titan, 100 nm Gold,
- Anlage : Balzers, ESQ 110, BB800 059BD mit 270°

Elektronenstrahlmullenkanone bei $2 \cdot 10^{-5}$ Torr, 150°C 1 nm/s
bzw. Laboranlage der Fa. Balzers

- Photolack AZ5218 E, positiv 4000 rpm, 30 s
- Mask-aligner : Karl Süss Modell MA 45, 360 nm 350 W , 7.5 s
- Photolack - Entwickler AZ - Developer / Hoechst 60 s
- Einbacken bei 120°C , 30 min
- Gold aetzen mit KI/I₂
- Titan aetzen mit gepufferter HF
- 30 min, 80°C, Ultraschall mit AZ - Remover
- Ethanol Waschschrift
- Kaschieren auf Haftfolie
- Sägen der Wafer mit 100 µm Diamantsäge

Beispiel 2 : Reinigung des Gramacidin A

Gramacidin A wird von Gramacidin B und C aus der Mischung (= Gramacidin D) auf einer Si - 100 Polyol Säule der Firma Serva mit einem Gradient von 0 - 80 % Methanol getrennt.

Beispiel 3 : Carboxyterminale Modifikation des Gramacidins

500 mg Gramacidin A werden mit 10 ml Benzol gerührt, ein 3 - 5 facher Überschuß des Carboxylgruppen modifizierten Liganden zugegeben und mit 10 fachem molaren Überschuß eines Carbodiimids (z.B. Dicyclohexylcarbodiimid) versetzt. Die Reaktion wird bei Raumtemperatur im Dunkeln vorgenommen. Der Verlauf der Reaktion wird auf Siligagel - Platten mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (Chloroform / Methanol / Wasser : 100/10/1) verfolgt.

Das Reaktionsgemisch wird sodann auf einer präparativen C-18 Reversed Phase Säule mit Methanol / Wasser gereinigt.

Beispiel 7: Reinigung von Platinsensorelektroden

Nach der Verwendung von löslichen Thio-Verbindungen sind Metalloberflächen chemisch bzw. elektrochemisch blockiert = derivatisiert. Um die kovalente Bindung der Thiole mit der Elektrodenoberfläche zu brechen, wird die Elektrode elektrochemisch zwischen -600 und +1200 mV (bis in den Bereich der Sauerstoffentwicklung) versus Ag/AgCl gereinigt. Die elektrochemische Reinigung erfolgt durch Anlegen einer zeitlich variablen Spannung an einen in neutralen Puffer eingetauchten Sensor.

Beispiel 8 : Lipid- und Kanalbeschichtung der Sensorelektroden

Die in einem organischen Lösungsmittel gelösten Lipide ($2-30 \mu\text{g} / 100 \text{ cm}^2$ Oberfläche) und modifizierte-Ionenkanäle ($10 - 10^8$ Moleküle / mm^2) werden an einer Luft/Flüssigkeit-Phasengrenze auf einem LB-Trog gespreitet. In einem automatisierten LB-System wird der Lipidfilm von einer fluiden in eine semikristalline Phase komprimiert. Der Sensor wird sodann durch den Lipidfilm gezogen wobei ein Nanoaktuator der Firma Physik-Instrumente/Deutschland (von einem DC-Motor mit der Auflösung von 60nm angetrieben) verwendet werden kann.

Ungesättigte Lipidfilme werden mit einer Photomaske bedeckt und durch das Licht einer 50W Mitteldruck Quecksilberdampf Lampe etwa 120 Sekunden vernetzt. Dabei werden die Lipide sowohl innerhalb der Lipidschicht als auch mit einem reaktiven Träger vernetzt. Der Einbau modifizierter Kanäle kann in analoger Weise mit Mischungen aus Lipid und Kanalpeptiden erfolgen.

Beispiel 9 : Kopplung von SH-Oligonukleotiden an ein NH₂-Kanalpeptid

Ein Kanalpeptid mit reaktiver NH₂-Gruppe (20mg/ml) wird in Phosphatpuffer 0.1 M / EDTA 0.1 M gelöst (bei hydrophoben Peptiden unter Zugabe eines Lösungsvermittlers) und 0.5-5mg/ml Sulfosuccinimidyl-(4-jodacetyl)aminobenzoat zugegeben. Die Reaktionsdauer beträgt bei Raumtemperatur und unter Lichtschutz 20-60 Minuten. Nach der Abtrennung des Kopplungsreagenzes durch HPLC wird ein 1-5 fach molarer Überschuß an SH-modifiziertem Oligonukleotid zugegeben. Die Reaktionsdauer beträgt bei 4°C und unter Lichtschutz 8 -16 Stunden. Als Reaktionslösung kann ein Phosphatbuffer 0.1 M mit 0.1 M EDTA pH = 8.3 verwendet werden. Der Überschuß an reaktivem Kanalpeptid wird mit Cystein abgefangen und die Mischung auf einer semipräparativen HPLC-Säule gereinigt.

Beispiel 10 : Kopplung von NH₂-Oligonukleotiden an ein SH-Kanalpeptid

Ein Oligonukleotid mit reaktiver, terminaler NH₂-Gruppe (20mg/ml) wird in NaHCO₃ 0.2 M / EDTA 0.1 M, pH = 9.3 gelöst (bei hydrophoben Peptiden unter Zugabe eines Lösungsvermittlers) und 0.5-5mg/ml Sulfosuccinimidyl-4N-maleinimidomethyl cyclohexan1-

Beispiel 13: Oligonukleotide für einen HIV1/2-Virus Sensor

Als Faengeroligonukleotide werden komplementaere Sequenzen von 15-30 bp zu Sequenzen aus dem Protein gp41 auf einem Oligonukleotidsynthesizer gewonnen. Als Sequenzen werden komplementaere Sequenzen zu den Nukleotidsequenzen die den folgenden Aminosaeuresequenzen entsprechen verwendet :

HIV1:	LGLWGCSGKLIC
	LGMWGCSGKLIC
HIV2:	LNSWGCAFRQVC

Beispiel 14: Aufbau einer Elektropolymermembranmatrix mit substituierten Polypyrrolen

Als Monomer koennen z.B.

1-Carboxyalkyl-pyrrol,

2-(1-Pyrroloacetyl)-glycin,

1-Alkylpyrrol,

4-Carboxybenzylpyrrol,

4-Nitrophenylpyrrol,

4-(3-Pyrrolo)-4-ketobuttersaeure,

3-((Keto-4-nitrophenyl)methyl)pyrrol oder analoge Verbindungen verwendet werden.

Die Monomere werden in 0.5 prozentiger Loesung in Acetonitril geloest und 2.5 % Leitsalz (LiClO_4 , NR_4BF_4 , NR_4PF_6 , $\text{R}=\text{Alkyl}$) zugegeben. Die klare Loesung wird 10 Minuten mit Argon gespült. Dann werden die Elektroden cyclovoltammetrisch mit den Elektropolymeren überzogen (Scangeschwindigkeit = 100mV/s). Der Spannungsbereich wird dabei so gewaehlt, daß eine deutliche anodische Stromzunahme durch den Polymerisationsvorgang waehrend der ersten Zyklen beobachtet werden kann z.B. -300 bis 1400 mV versus Ag/AgCl.

Beispiel 15 : Reduktion von 1,24-Tetracosandisaeure (Figur 2)

Ansatz 1: 0.005 mol 1,24-Tetracosandisaeure (2 g)

0.0083 mol LiAlH_4 (8.3 ml einer 1M Lösung in THF)

60 ml Pyridin getrocknet über Molekularsieb 4Å

Die Tetracosandisaeure wird in 60 ml trockenem Pyridin gelöst, das LiAlH_4 unter Rühren zugetropft. Anschließend wird die Reaktionslösung 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird auf Eiswasser gegossen, der Niederschlag abgenutscht, mit 3N HCl, H_2O und gesaettigter NaCl Lösung gewaschen und aus Toluol umkristallisiert. Um den Erfolg der Reaktion zu überprüfen, wird eine Dünnschichtchromatographie durchgeführt.

Das Reaktionsgemisch wird in 35 ml trockenem Toluol (über Molekularsieb 4Å) mindestens 8 h refluxt. Beim Abkühlen fäellt das Produkt aus. Um den Erfolg der Reaktion zu überprüfen, kann eine Dünnschichtchromatographie (Kieselgelplatte mit Fluoreszenzindikator 254 nm) durchgeführt werden.

Laufmittel: Toluol/Dioxan/Essigsäure = 90/25/4

Detektion: UV-Lampe, 254 nm

Ausbeute: 2.27 g (87% der Theorie)

Beispiel 19 : Synthese von 1,6,23,28 Tetraoxacyclotetratetraconta-3,25dien-2,5,24,27 tetron (Figur 3)

Ansatz: 0.0022 mol

Bis-(2-butendicarboxysäure)-1,16-hexadecadiylester (1 g)

0.0022 mol 1,16-Hexadecadiol (0.57 g)

0.22 g p-Toluolsulfonsäure

Das Reaktionsgemisch wird in 200 ml Toluol unter Rückfluß mindestens 8 h gekocht. Das Lösungsmittel wird abgedampft und der Rückstand aus Ethylacetat umkristallisiert. Um den Erfolg der Reaktion zu überprüfen, wird eine Dünnschichtchromatographie (Kieselgelplatte mit Fluoreszenzindikator 254 nm) durchgeführt.

Laufmittel: Toluol/Dioxan/Essigsäure = 90/25/4

Detektion: UV-Lampe, 254 nm

Ausbeute: 0.32 g

6. Biosensor nach Anspruch 1 und 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran auf den wasserhaltigen und oder leitfähigen kovalent oder ionisch vernetzten Polymeren, Biopolymeren, Gelen, Dendrimeren oder kristallinen Festkörpern kovalent gebunden ist.

7. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß er einen Rahmen für die Membran aufweist, der durch Photostrukturieren einer Dünnschicht von Polymeren, Gläsern, Keramiken, Kohlenstoff, Metallen oder Halbleitern erzeugt ist.

8. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Kanalmoleküle aus Peptiden oder Proteinen verwendet werden.

9. Biosensor nach Anspruch 1 und 8, dadurch gekennzeichnet, daß als Kanäle Peptidkanäle mit einer 6.3 Helix verwendet werden.

10. Biosensor nach Anspruch 1, 8 und 9, dadurch gekennzeichnet, daß als Kanäle Peptidkanäle aus Gramicidinen, modifizierten Gramicidinen und deren kovalent verknüpften Dimeren insbesondere N-terminal verknüpften Dimeren verwendet werden.

11. Biosensor nach Anspruch 1 und 8, dadurch gekennzeichnet, daß als Kanäle kovalent vernetzte Alamethicin Kanäle verwendet werden.

12. Biosensor nach Anspruch 1 und 8, dadurch gekennzeichnet, daß als Kanäle stabile monomere Bakterientoxine verwendet werden.

13. Biosensor nach Anspruch 1 und 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Liganden am oder nahe dem Carboxyterminus des Kanalpeptids gebunden sind.

14. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Kanäle synthetische zyklische Peptide oder zyklische aus Zuckereinheiten aufgebaute Moleküle wie hydrophob modifizierte Cyclodextrine verwendet werden.

15. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß er als Kanäle Löcher in einer Membran aufweist.

16. Biosensor nach Anspruch 1 und 15, dadurch gekennzeichnet, daß eine Membran mit Löchern, hergestellt durch radioaktiven Beschuss der Membran, durch naßchemisches Ätzen, durch Plasmaätzen, durch Aufbau einer Isolationsschicht um leitende Inseln, mit nanotechnologischen Scannern oder Stempeltechniken, verwendet wird.

17. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran auf einer Seite von einer wässrigen/organischen oder organischen oder siliziumorganischen Flüssigkeit bedeckt ist.

18. Biosensor nach Anspruch 1 und 17, dadurch gekennzeichnet, daß in der organischen oder siliziumorganischen Flüssigkeit Salze oder Ionencarrier gelöst sind.

19. Verfahren zur Bestimmung der Konzentration von DNA und RNA mit Hilfe eines Biosensors nach den Ansprüchen 1, 4 und 5, dadurch gekennzeichnet, daß die durch die Hybridisierung in den Membrankanälen hervorgerufene Änderung des Ionen- und/oder Elektronenstroms gemessen wird.

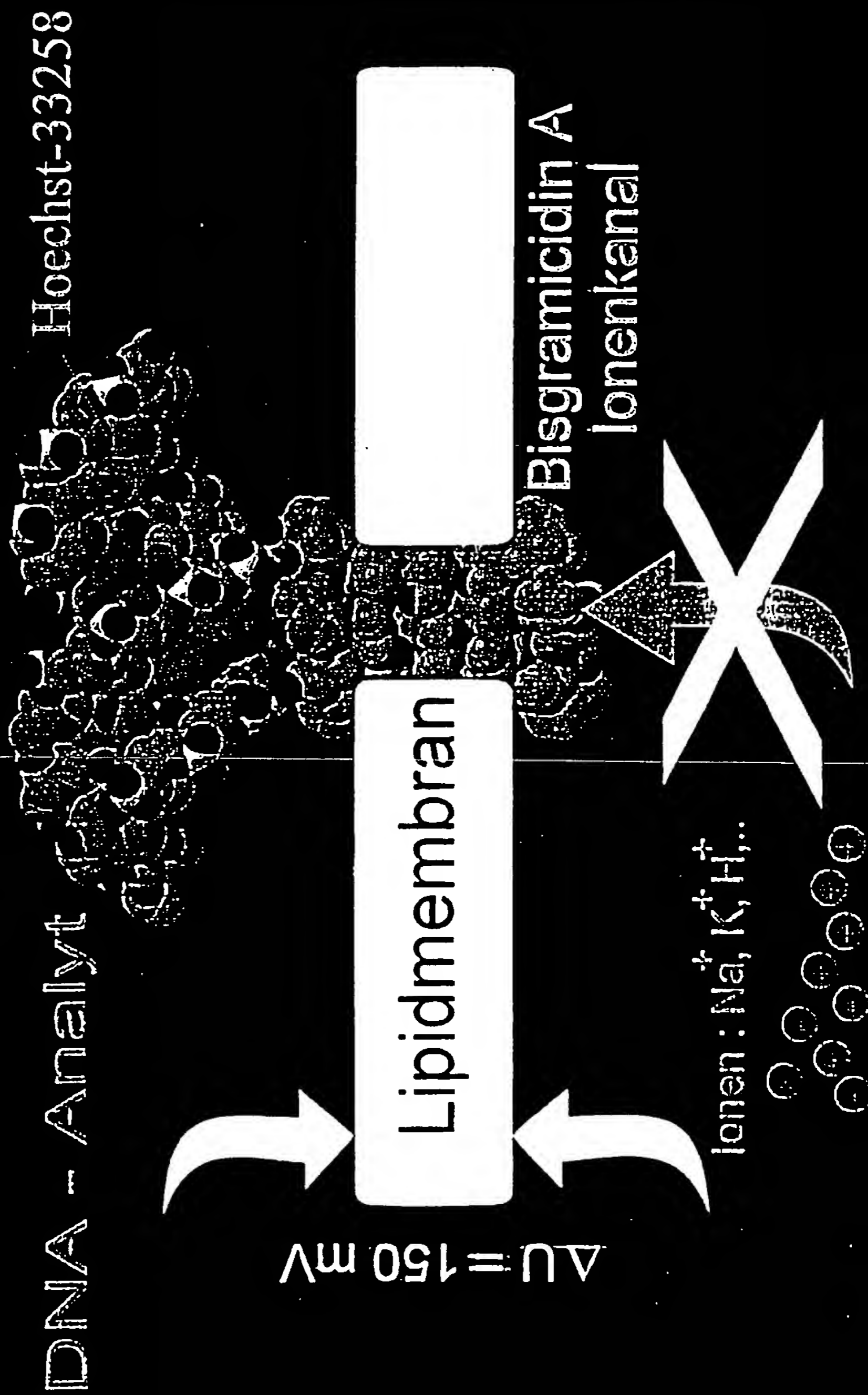
verbunden werden, welche danach durch Oxidation mit z.B. Osmiumtetroxid in vicinale cis-Diole umgewandelt werden.

33. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die cis-Diole mit Boronsäuren der benachbarten Schicht Addukte bilden.

34. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die beiden Transmembranketten der Lipide nach Figur 4/I durch Linker aus Maleinsäureestern verbunden werden, welche danach durch Addition von Thiolen, beispielsweise Hydroxyalkylthiolen oder Mercaptopropylsilanen derivatisiert oder vernetzt werden.

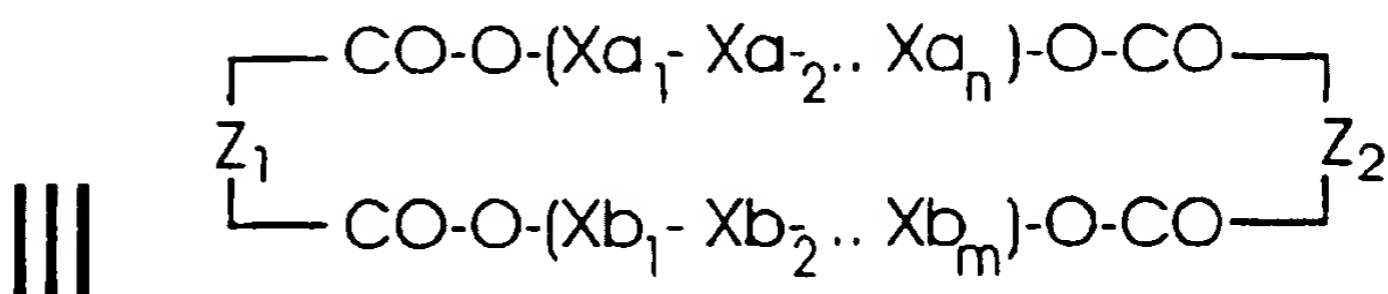
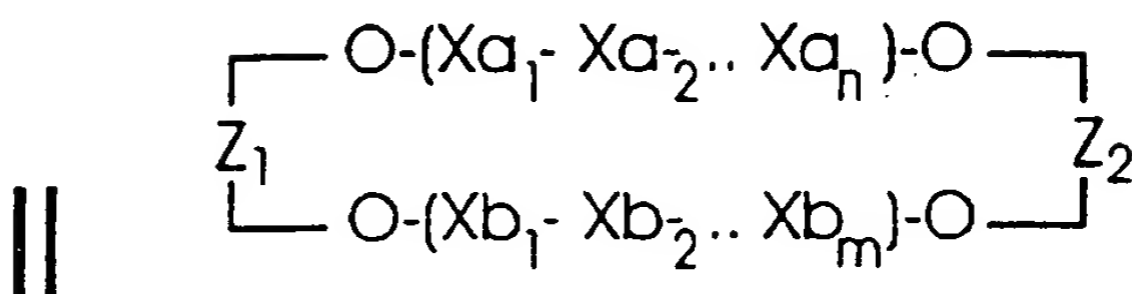
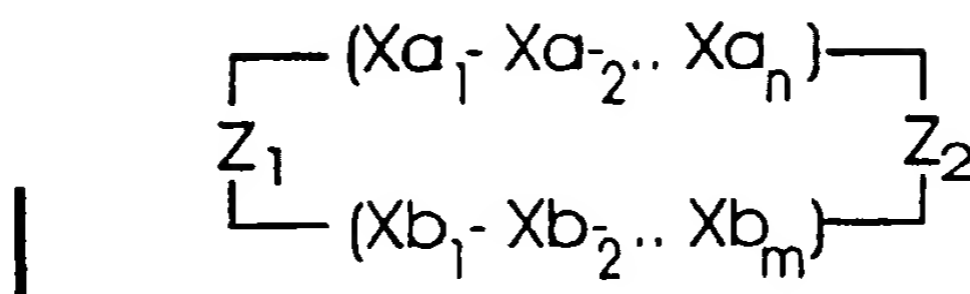
35. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die beiden Transmembranketten der Lipide nach Figur 4/I durch Linker aus Maleinsäureestern verbunden werden, welche danach durch Addition von Borverbindungen, insbesondere Borhalogeniden derivatisiert werden.

Ionenfluß modulierender Peptidkanal- DNA/RNA-Biosensor



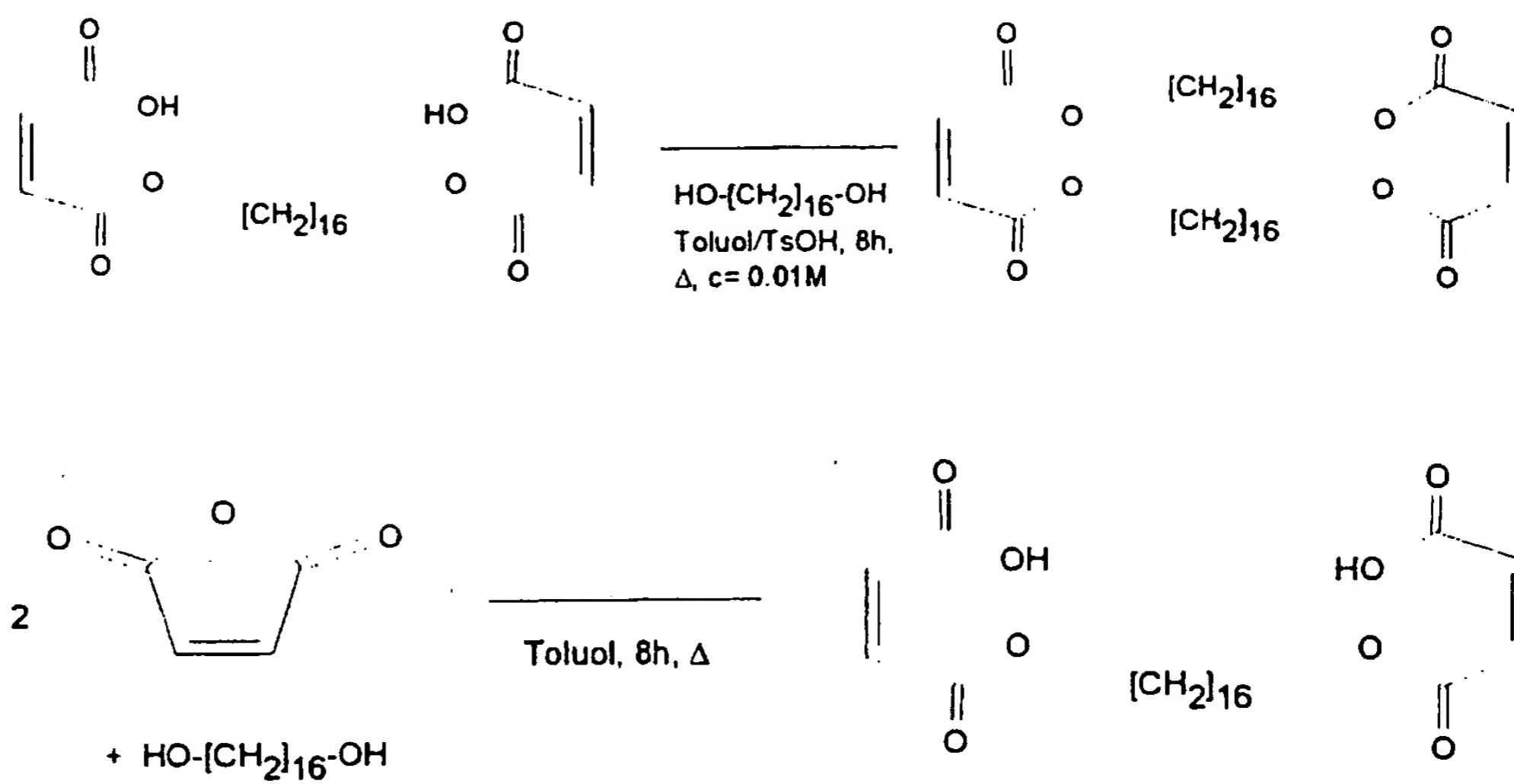
- Fig. 4 -

Formeln I, II und III:



- Fig. 6 -

Reaktionsvorschrift:



C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 234 566 A (OSMAN PETER D J ET AL) 10 August 1993 cited in the application see the whole document -----	1,19

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 G01N27/327 C12Q1/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12Q G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 89 01159 A (COMMW SCIENT IND RES ORG) 9. Februar 1989 siehe das ganze Dokument ---	1,19
A	US 4 388 166 A (SUZUKI SHUICHI ET AL) 14. Juni 1983 siehe das ganze Dokument ---	1,19
A	DE 40 27 728 A (BAYER AG) 5. März 1992 siehe das ganze Dokument ---	1,19
A	EP 0 441 120 A (YEDA RES & DEV) 14. August 1991 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1,19
-/-		

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

* A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

* E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

* L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

* O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

* P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

* T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

* X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

* Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

* &* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

24. Februar 1997

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

- 5 -03- 1997

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Moreno, C

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 8901159 A	09-02-89	AT 113724 T	15-11-94
		AU 2127988 A	01-03-89
		CA 1335879 A	13-06-95
		DE 3852036 D	08-12-94
		DE 3852036 T	09-03-95
		EP 0382736 A	22-08-90
		JP 3503209 T	18-07-91
		US 5436170 A	25-07-95

US 4388166 A	14-06-83	JP 1365389 C	26-02-87
		JP 56027643 A	18-03-81
		JP 61029667 B	08-07-86
		EP 0025110 A	18-03-81

DE 4027728 A	05-03-92	AT 135745 T	15-04-96
		DE 59107591 D	25-04-96
		WO 9204465 A	19-03-92
		EP 0546032 A	16-06-93
		JP 6500465 T	20-01-94

EP 0441120 A	14-08-91	IL 93020 A	29-06-95
		AT 130938 T	15-12-95
		AU 625017 B	25-06-92
		AU 6924591 A	11-07-91
		CA 2033776 A	10-07-91
		DE 69114870 D	11-01-96
		DE 69114870 T	29-08-96
		ES 2082867 T	01-04-96
		JP 6090736 A	05-04-94
		US 5204239 A	20-04-93

US 5234566 A	10-08-93	AT 136119 T	15-04-96
		AU 4078789 A	23-03-90
		WO 9002327 A	08-03-90
		CA 1315338 A	30-03-93
		DE 68926118 D	02-05-96
		DE 68926118 T	22-08-96
		EP 0432188 A	19-06-91
